

• 化学成分 •

徐长卿逆转肿瘤多药耐药活性部位化学成分研究

褚文希, 刘小红, 刘 坤, 霍立娜, 姚慧丽, 高 琪, 高 华, 王 威*

青岛大学药学院, 山东 青岛 266021

摘要: 目的 研究徐长卿 *Cynanchum paniculatum* 逆转肿瘤多药耐药活性部位的化学成分。方法 MTT 法评价徐长卿提取物分离部位逆转 3 种人肿瘤耐药细胞株对临床常用化疗药物的耐药作用, 采用 ODS 柱色谱和制备 HPLC 等技术方法对活性部位进行分离, 运用理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。结果 徐长卿提取物分离部位显著逆转人胃癌耐药细胞株 SGC-7901/VCR 和人结肠癌耐药细胞株 HCT-8/VCR 对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的耐药作用。从活性部位中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为华北白前苷元 B 3-*O*- β -D-吡喃夹竹桃糖苷 (1)、3 β ,14-二羟基-14 β -孕甾-5-烯-20-酮 (2)、新白薇苷元 F (3)、白前苷元 A (4)、白前苷元 C (5)、新白薇苷元 F 3-*O*- β -D-吡喃夹竹桃糖苷 (6)、白前苷元 C 3-*O*- β -D-吡喃黄花夹竹桃糖苷 (7)、白前苷元 A 3-*O*- β -D-吡喃夹竹桃糖苷 (8)、20-羟基-4,6-二烯-孕甾-3-酮 (9)。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为徐长卿苷 D; 徐长卿 C₂₁ 甾体化合物具有潜在的逆转肿瘤多药耐药作用。

关键词: 徐长卿; 肿瘤多药耐药; C₂₁ 甾体化合物; 华北白前苷元 B 3-*O*- β -D-吡喃夹竹桃糖苷; 徐长卿苷 D

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2674-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.002

Chemical constituents from active fraction in roots and rhizomes of *Cynanchum paniculatum* with reversal activity of multidrug resistance

CHU Wen-xi, LIU Xiao-hong, LIU Kun, HUO Li-na, YAO Hui-li, GAO Qi, GAO Hua, WANG Wei

College of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266021, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from the active fraction in the roots and rhizomes of *Cynanchum paniculatum* with reversal activity of multidrug resistance. **Methods** The active fraction was evaluated for reversing activities toward three human drug-resistance cell lines to clinically common used anticancer chemotherapeutic drugs. The compounds were isolated and purified by chromatography on ODS and preparative HPLC. Their structures were elucidated on the basis of chemical and spectroscopic methods, including MS, 1D, and 2D NMR spectral techniques. **Results** The active fraction exhibited the significant effects in sensitization of human drug-resistance on gastric carcinoma cell line SGC-7901/VCR and human drug-resistance on colonic carcinoma cell line HCT-8/VCR to fluorouracil (5-FU). Nine compounds were isolated and identified as hancogenin B 3-*O*- β -D-oleandropyranoside (1), 3 β ,14-dihydroxy-14 β -pregn-5-en-20-one (2), neocynapanogenin F (3), glaucogenin A (4), glaucogenin C (5), neocynapanogenin F 3-*O*- β -D-oleandropyranoside (6), glaucogenin C 3-*O*- β -D-thevetoside (7), glaucogenin A 3-*O*- β -D-oleandropyranoside (8), and 20-hydroxypregna-4,6-dien-3-one (9). **Conclusion** Compound 1 is a new steroidal saponin named paniculatumsoside D. C₂₁ Steroids isolated from the active fraction in the roots and rhizomes of *C. paniculatum* have the potential value as multidrug resistance reversing agents.

Key words: *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag.; multidrug resistance; C₂₁ steroids; hancogenin B 3-*O*- β -D-oleandropyranoside; paniculatumsoside D

化疗是恶性肿瘤综合疗法的方法之一, 广泛用于术前、术中和术后, 但肿瘤多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 现象严重影响化疗对恶性肿瘤的

疗效。克服肿瘤的 MDR, 恢复耐药肿瘤对药物的敏感性, 寻找高效低毒的肿瘤 MDR 逆转剂是当前肿瘤治疗药物的研究方向^[1-4]。徐长卿 *Cynanchum*

收稿日期: 2015-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273396); 山东省高等学校科技计划项目 (J15LM12)

作者简介: 褚文希 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分研究。

*通信作者 王 威 (1972—), 男, 教授, 博士研究生导师。Tel: (0532)82991172 E-mail: w.w.wangwei@263.net

paniculatum (Bge.) Kitag. 为萝藦科鹅绒藤属多年生草本植物, 其干燥根和根茎入药, 味辛、性温, 归肝、肾经, 具有祛风化湿、止痛止痒的功能, 用于治疗风湿痹痛、胃痛胀满、牙痛、腰痛、跌打伤痛、风疹、湿疹等症^[5]。其主要成分丹皮酚具有抗炎镇痛、抗病毒、抗菌、抗蛇毒、免疫调节、抗肿瘤、保护心血管等作用^[6]。C₂₁甾体化合物为徐长卿化学成分类型之一, 但未见其生物活性的相关研究报道^[7-9]。为探讨不同结构类型C₂₁甾体化合物逆转肿瘤MDR构效关系, 选择徐长卿作为研究对象, 采用MTT法评价徐长卿提取物分离部位逆转人胃癌耐药细胞株SGC-7901/VCR、人结肠癌耐长春新碱耐药株HCT-8/VCR和人肺癌紫杉醇耐药株A549/T对4种常用肿瘤化疗药物注射用盐酸多柔比星(ADM)、顺铂(DDP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、紫杉醇(PAC)耐药作用。结果表明分离部位显著逆转人胃癌耐药细胞株SGC-7901/VCR和人结肠癌耐药细胞株HCT-8/VCR对5-FU耐药作用。采用ODS柱色谱和制备HPLC等手段对活性部位化学成分进行了研究, 从中分离鉴定了9个C₂₁甾体化合物, 分别为华北白前苷元B 3-O-β-D-吡喃夹竹桃糖苷(hancogenin B 3-O-β-D-oleandropyranoside, 1)、3β,14-二羟基-14β-孕甾-5-烯-20-酮(3β,14-dihydroxy-14β-pregn-5-en-20-one, 2)、新白薇苷元F(neocynapanogenin F, 3)、白前苷元A(glaucogenin A, 4)、白前苷元C(glaucogenin C, 5)、新白薇苷元F 3-O-β-D-吡喃夹竹桃糖苷(neocynapanogenin F 3-O-β-D-oleandropyranoside, 6)、白前苷元C 3-O-β-D-吡喃黄花夹竹桃糖苷(glaucogenin C 3-O-β-D-thevetoside, 7)、白前苷元A 3-O-β-D-吡喃夹竹桃糖苷(glaucogenin A 3-O-β-D-oleandropyranoside, 8)、20-羟基-4,6-二烯-孕甾-3-酮(20-hydroxypregna-4,6-dien-3-one, 9)。其中化合物1为新化合物, 命名为徐长卿苷D; 徐长卿C₂₁甾体化合物具有潜在逆转肿瘤MDR作用。

1 仪器与材料

Bruker AV-500 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Bruker micro TOFQ 飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司); NP 7005C 制备液相色谱输液泵(江苏汉邦科技有限公司); Shodex RI-102 制备液相色谱示差折光检测器(日本昭光电工株式会社); MCO-18AIC(UV)型二氧化碳培养箱(日本三洋电机株式会社); Dmilled 型倒置生物显微镜(德国

徕卡公司); DM2500 正置生物显微镜(德国徕卡公司); Sigma 3-18K 型台式高速离心机(德国 Sigma 公司); S70-CD-1FD 型单人超净工作台(上海博讯实业有限公司); ST-360 型酶标仪(上海科华实验系统有限公司); AL104 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司)。

盐酸维拉帕米注射液(上海禾丰制药有限公司, 批号 120904); ADM(深圳万乐药业有限公司, 批号 1212E1); 5-FU 注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号 1310261); DDP 注射液(云南个旧生物药业有限公司, 批号 130701); PAC 注射液(江苏奥赛康药业股份有限公司, 批号 D131101); RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司, 批号 1256837); 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 120626); 噻唑蓝(美国 Genview 公司, 批号 46170204106); 胰蛋白酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 批号 09R10380); 人胃癌耐药细胞株SGC-7901/VCR(上海天呈科技有限公司); 人结肠癌耐药细胞株HCT-8/VCR和人肺癌耐药细胞株A549/T(上海博谷生物科技有限公司); Megres C₁₈ 色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司); 柱色谱用大孔吸附树脂HPD-100(河北沧州宝恩化工有限公司); 柱色谱用脱色树脂D941(山东鲁抗医药股份有限公司); 柱色谱用ODS(日本YMC株式会社); 薄层色谱用ODS板(RP₁₈ F₂₅₄, 德国默克公司); 色谱用甲醇(美国天地公司); 水为重蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

徐长卿药材2014年3月购于安徽亳州敬德药业有限责任公司, 经大连大学冯宝民教授鉴定为萝藦科鹅绒藤属植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 的根和根茎, 标本(CPXCQ-2014-03)存放于青岛大学药学院。

2 方法与结果

2.1 药材提取与分离部位制备

徐长卿干燥根和根茎10 kg, 切段, 加5倍量90%乙醇回流提取2次, 每次1.5 h, 分次滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇得乙醇提取物1.5 kg。取乙醇提取物1.2 kg, 加水使溶解, 经HPD-100大孔树脂柱色谱, 依次用水和30%、70%、95%乙醇洗脱至近无色, 收集70%乙醇洗脱液, 经D941脱色树脂柱色谱, 用95%乙醇洗脱至近无色, 收集洗脱液, 减压回收乙醇得分离部位15 g。

2.2 分离部位对MDR细胞株耐药性的逆转作用

取对数生长期的人胃癌耐药细胞株SGC7901/VCR、人结肠癌耐药细胞株HCT-8/VCR和人肺癌耐药细胞株A549/T,用含10% FBS的RPMI 1640培养液调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,接种于96孔细胞培养板中,每孔100 μ L,置于含有5% CO₂的37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24 h后,在各孔中分别加入50 μ L含不同浓度分离部位或盐酸维拉帕米(8 μ g/mL)的培养基和50 μ L含有不同浓度化疗药物的培养基,另设溶剂对照组(细胞和培养液)和空白对照组(培养液),每组均设4个复孔,加药后继续培养48 h后,在各孔中加入5 mg/mL的MTT 20 μ L,继续培养4 h,吸弃培养液,在各孔中加入DMSO 150 μ L,经微量混合振荡器振荡10 min后,全自动酶联免疫检测仪于570 nm处测定吸光度值,计算抑制率。应用对数回归分析法计算各组半数抑制浓度(IC₅₀),计算逆转倍数(RF),RF=化疗药IC₅₀均值/(化疗药+逆转剂)IC₅₀均值。结果表明:(1)分离部位显著逆转人胃癌耐药细胞株SGC7901/VCR对5-FU的耐药作用,单独5-FU IC₅₀=(29.63 $\pm$ 0.83) μ g/mL,5-FU联合分离部位(50 μ g/mL) IC₅₀=(1.67 $\pm$ 1.53) μ g/mL,RF为17.86倍,5-FU联合盐酸维拉帕米(8 μ g/mL) IC₅₀=(10.54 $\pm$ 2.68) μ g/mL,RF为2.83倍;(2)分离部位显著逆转人结肠癌耐药细胞株HCT-8/VCR对5-FU的耐药作用,单独5-FU IC₅₀=(31.87 $\pm$ 1.49) μ g/mL,5-FU联合分离部位(50 μ g/mL) IC₅₀=(0.37 $\pm$ 0.06) μ g/mL,RF为86.14倍,5-FU联合盐酸维拉帕米(8 μ g/mL) IC₅₀=(10.44 $\pm$ 1.23) μ g/mL,RF为3.05倍。

2.3 活性部位化学成分分离

取活性分离部位11 g,经ODS柱色谱,以甲醇-水(3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2)洗脱得16个组分Fr. 1~16。Fr. 12经制备HPLC(甲醇-水52:48)得化合物1(4.13 mg)和2(2.59 mg);Fr. 10经制备HPLC(甲醇-水45:55)得化合物3(37.74 mg)和4(8.84 mg);Fr. 13经制备HPLC(甲醇-水55:45)得化合物5(47.84 mg);Fr. 14经制备HPLC(甲醇-水60:40)得化合物6(27.66 mg)、7(3.94 mg)、8(13.31 mg)和9(4.29 mg)。

2.4 结构鉴定

化合物1:白色无定形粉末(甲醇),Libermann-Burchard和Keller-Kiliani反应阳性,HR-ESI-MS谱显示准分子离子峰 m/z : 559.252 3 [M+Na]⁺,结合

¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)和¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N)谱数据推测分子式为C₂₈H₄₀O₁₀(C₂₈H₄₀O₁₀Na,计算值559.251 9)。NMR谱显示为13,14:14,15-双裂环孕甾烷母核特征:¹H-NMR谱显示2个角甲基质子信号 δ 0.96(3H, s, H-19)和1.78(3H, s, H-21),2个烯质子信号 δ 5.49(1H, brd, J =4.8 Hz, H-6)和6.68(1H, s, H-18),3个与氧相连的次甲基质子信号 δ 3.65(1H, m, H-3),4.06(1H, m, H-2)和6.02(1H, dd, J =9.0, 7.4 Hz, H-16),1个与氧相连的亚甲基质子信号 δ 4.02(1H, dd, J =9.2, 9.0 Hz, H-15 β)和4.33(1H, dd, J =9.2, 7.4 Hz, H-15 α);¹³C-NMR谱显示2个角甲基碳信号 δ 19.0(C-19)和20.7(C-21),1个与氧相连的亚甲基碳信号 δ 67.3(C-15),3个与氧相连的次甲基碳信号 δ 70.0(C-2), 82.1(C-16)和85.2(C-3),1个与氧相连的季碳信号 δ 92.5(C-17),4个烯碳信号 δ 119.0(C-13), 120.9(C-6), 139.7(C-5), 144.7(C-18),1个缩酮碳信号 δ 119.8(C-20)和1个羰基碳信号 δ 175.5(C-14)。综合解析以上数据并与文献对照^[10],鉴定化合物1的苷元为华北白前苷元B。¹H-NMR谱显示糖端基质子信号 δ 4.85(1H, dd, J =8.4, 1.6 Hz, H-1'),1个甲基质子信号 δ 1.55(3H, d, J =6.0 Hz, H-6'),1个甲氧基质子信号 δ 3.48(3H, s, 3'-OCH₃);¹³C-NMR谱显示一组糖基碳信号 δ 99.3(C-1'), 37.3(C-2'), 81.5(C-3'), 76.1(C-4'), 73.2(C-5'), 18.4(C-6')和57.1(3'-OCH₃),结合糖端基质子耦合常数和C-2化学位移并与文献对照^[11-12],推测结构中存在 β -D-吡喃夹竹桃糖基。与华北白前苷元B比较,C-2、C-3和C-4的苷化位移分别为-2.7、8.2和-4.2, HMBC谱显示夹竹桃糖端基质子 δ_{H} 4.86与华北白前苷元B的3位碳 δ_{C} 85.2远程相关信号,推测夹竹桃糖基的C-1位与华北白前苷元B的C-3位相连。综合解析以上数据,鉴定化合物1结构为华北白前苷元B 3-O- β -D-吡喃夹竹桃糖苷(图1)。该化合物未见文献报道,为新化合物。化合物1的数据归属见表1。

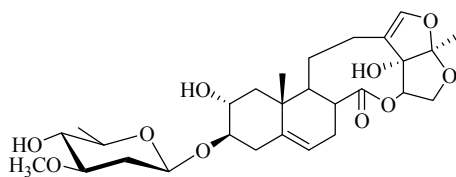


图1 化合物1的结构

Fig. 1 Structure of compound 1

表1 化合物1的¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N)、¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) 和 HMBC 数据
Table 1 ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N), ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N), and HMBC data of compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	1.27 (m), 2.52 (m)	44.9	C-2, 3, 9, 10, 19
2	4.06 (m)	70.0	
3	3.65 (m)	85.2	C-2, 1'
4	2.49 (m), 2.60 (m)	37.5	C-2, 3, 5, 6, 10
5	—	139.7	
6	5.49 (brd, $J = 4.8$ Hz)	120.9	C-4, 7, 8, 10
7	2.18 (m), 2.71 (m)	28.6	
8	2.56 (m)	40.3	C-9, 14
9	1.41 (m)	52.8	C-1, 8, 10, 11, 12
10	—	39.6	
11	1.60 (m), 2.24 (m)	30.7	
12	1.85 (m), 2.46 (m)	20.8	
13	—	119.0	
14	—	175.5	
15	4.02 (dd, $J = 9.2, 9.0$ Hz), 4.33 (dd, $J = 9.2, 7.4$ Hz)	67.3	C-16, 17, 20
16	6.02 (dd, $J = 9.0, 7.4$ Hz)	82.1	C-13, 14, 15, 20
17	—	92.5	
18	6.68 (s)	144.7	C-13, 17, 20
19	0.96 (s)	19.0	C-1, 9, 10
20	—	119.8	
21	1.78 (s)	20.7	C-17, 20
β -D-ole	—		
1'	4.85 (dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz)	99.3	C-3
2'	1.76 (m), 2.55 (m)	37.3	C-3', 4'
3'	3.50 (m)	81.5	
4'	3.49 (m)	76.1	
5'	3.66 (m)	73.2	C-1', 3', 4'
6'	1.55 (d, $J = 6.0$ Hz)	18.4	C-4', 5'
-OCH ₃	3.48 (s)	57.1	C-3'

化合物2: 无色固体(甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 355 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合¹H-和¹³C-NMR 谱数据推测分子式为C₂₁H₃₂O₃。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.47 (1H, s, H-6), 3.87 (1H, m, H-3), 2.86 (1H, dd, $J = 9.3, 3.8$ Hz, H-17), 2.23 (3H, s, H-21), 1.13 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 216.7 (C-20), 140.6 (C-5), 121.9 (C-6), 85.1 (C-14), 71.2 (C-3), 63.2 (C-17), 49.4 (C-13), 46.4 (C-9), 43.4 (C-4), 38.9 (C-12), 37.9 (C-1), 37.4 (C-10), 37.2 (C-8), 34.6

(C-15), 32.6 (C-21), 32.4 (C-2), 27.9 (C-7), 24.5 (C-16), 21.2 (C-11), 19.7 (C-19), 15.5 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物2为3 β ,14-二羟基-14 β -孕甾-5-烯-20-酮。

化合物3: 无色固体(甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 结合¹H-和¹³C-NMR 谱数据推测分子式为C₂₁H₂₈O₆。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 6.68 (1H, s, H-18), 6.02 (1H, dd, $J = 8.5, 7.6$ Hz, H-16), 5.38 (1H, brd, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.34 (1H, dd, $J = 9.2, 7.4$ Hz,

H-15 α), 4.03 (1H, dd, $J = 9.2, 9.0$ Hz, H-15 β), 3.81 (1H, m, H-3), 1.78 (3H, s, H-21), 0.94 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 175.8 (C-14), 144.7 (C-18), 141.5 (C-5), 123.3 (C-13), 119.8 (C-6), 119.1 (C-20), 92.5 (C-17), 82.1 (C-16), 71.1 (C-3), 67.3 (C-15), 53.0 (C-9), 43.1 (C-4), 40.9 (C-8), 38.8 (C-10), 36.9 (C-1), 32.4 (C-2), 30.7 (C-12), 28.5 (C-7), 21.0 (C-11), 20.7 (C-21), 18.2 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **3** 为新白薇苷元 F。

化合物 **4**: 无色固体 (甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据推测分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.47 (1H, s, H-18), 5.45 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-6), 4.26 (1H, dd, $J = 8.2, 7.2$ Hz, H-15 α), 4.15 (1H, m, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 9.4, 8.8$ Hz, H-15 β), 3.82 (1H, m, H-3), 3.56 (1H, brd, $J = 7.9$ Hz, H-17), 1.56 (3H, s, H-21), 0.98 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 175.5 (C-14), 143.8 (C-18), 140.9 (C-5), 120.1 (C-6), 118.6 (C-20), 114.4 (C-13), 76.8 (C-3), 75.6 (C-16), 72.4 (C-2), 67.8 (C-15), 56.2 (C-17), 53.2 (C-9), 45.6 (C-1), 40.6 (C-8), 40.4 (C-10), 40.1 (C-4), 30.1 (C-12), 28.5 (C-7), 24.8 (C-21), 23.9 (C-11), 19.2 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **4** 为白前苷元 A。

化合物 **5**: 无色固体 (甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据推测分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.49 (1H, s, H-18), 5.46 (1H, m, H-16), 5.38 (1H, brd, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.26 (1H, m, H-15 α), 3.98 (1H, m, H-15 β), 3.83 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, brd, $J = 7.7$ Hz, H-17), 1.56 (3H, s, H-21), 0.92 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 175.6 (C-14), 143.9 (C-18), 141.6 (C-5), 119.8 (C-6), 118.6 (C-20), 114.5 (C-13), 75.6 (C-16), 71.2 (C-3), 67.9 (C-15), 56.3 (C-17), 53.3 (C-9), 43.1 (C-4), 40.8 (C-8), 38.7 (C-10), 36.8 (C-1), 32.4 (C-2), 30.1 (C-12), 28.5 (C-7), 24.8 (C-21), 24.0 (C-11), 18.1 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **5** 为白前苷元 C。

化合物 **6**: 白色无定形粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Keller-kiliani 反应阳性, ESI-MS m/z : 543

$[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据推测分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.67 (1H, s, H-18), 6.02 (1H, dd, $J = 8.2, 7.8$ Hz, H-16), 5.45 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-6), 4.89 (1H, dd, $J = 9.2, 1.8$ Hz, H-1'), 4.33 (1H, dd, $J = 9.2, 7.4$ Hz, H-15 α), 4.03 (1H, dd, $J = 9.1, 9.0$ Hz, H-15 β), 3.82 (1H, m, H-3), 3.48 (3H, s, 3'-OCH₃), 1.78 (3H, s, H-21), 1.61 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6'), 0.90 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 175.7 (C-14), 144.7 (C-18), 140.6 (C-5), 120.6 (C-6), 119.8 (C-13), 119.0 (C-20), 98.3 (C-1'), 92.5 (C-17), 82.1 (C-16), 81.7 (C-3'), 77.4 (C-3), 76.5 (C-4'), 72.9 (C-5'), 67.2 (C-15), 57.0 (3'-OCH₃), 53.0 (C-9), 40.8 (C-8), 39.1 (C-4), 38.8 (C-10), 37.5 (C-2'), 36.6 (C-1), 30.6 (C-2), 30.2 (C-12), 28.6 (C-7), 20.9 (C-11), 20.7 (C-21), 18.8 (C-6'), 18.0 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为新白薇苷元 F 3-O- β -D-吡喃夹竹桃糖苷。

化合物 **7**: 白色无定形粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性和 Molish 反应阳性, ESI-MS m/z : 543 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据推测分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.48 (1H, s, H-18), 5.45 (1H, ddd, $J = 9.4, 7.7, 7.6$ Hz, H-16), 5.37 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6), 4.90 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 4.25 (1H, dd, $J = 8.4, 7.1$ Hz, H-15 α), 3.96 (1H, dd, $J = 9.4, 8.8$ Hz, H-15 β), 3.93 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.88 (1H, m, H-3), 3.57 (1H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-17), 1.62 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'), 1.56 (3H, s, H-21), 0.80 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 175.5 (C-14), 143.9 (C-18), 140.7 (C-5), 120.4 (C-6), 118.6 (C-20), 114.4 (C-13), 102.5 (C-1'), 88.1 (C-3'), 78.2 (C-3), 76.0 (C-4'), 75.6 (C-16), 75.1 (C-2'), 72.7 (C-5'), 67.8 (C-15), 60.9 (3'-OCH₃), 56.2 (C-17), 53.3 (C-9), 40.7 (C-8), 39.0 (C-4), 38.7 (C-10), 36.6 (C-1), 30.1 (C-12), 30.0 (C-2), 28.5 (C-7), 24.8 (C-21), 24.0 (C-11), 18.7 (C-19), 17.9 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为白前苷元 C 3-O- β -D-吡喃黄花夹竹桃糖苷。

化合物 **8**: 白色无定形粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Keller-kiliani 反应阳性, ESI-MS m/z : 543 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据推测分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 6.49 (1H, s, H-18), 5.50 (1H, brd, $J = 4.8$ Hz, H-6), 5.46

(1H, m, H-16), 4.87 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, dd, $J = 7.8, 7.6$ Hz, H-15 α), 4.06 (1H, m, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 9.1, 9.0$ Hz, H-15 β), 3.70 (1H, ddd, $J = 11.8, 8.8, 6.0$ Hz, H-3), 3.56 (1H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-17), 3.48 (3H, s, 3'-OCH₃), 1.56 (3H, d, $J = 5.7$ Hz, H-6'), 1.56 (3H, s, H-21), 0.95 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 175.4 (C-14), 143.9 (C-18), 139.9 (C-5), 120.8 (C-6), 118.6 (C-20), 114.4 (C-13), 99.4 (C-1'), 85.3 (C-3), 81.5 (C-3'), 76.1 (C-4'), 75.6 (C-16), 73.1 (C-5'), 70.0 (C-2), 67.8 (C-15), 57.1 (3'-OCH₃), 56.2 (C-17), 53.1 (C-9), 44.8 (C-1), 40.3 (C-8), 39.6 (C-10), 37.5 (C-4), 37.3 (C-2'), 30.1 (C-12), 28.5 (C-7), 24.8 (C-21), 23.9 (C-11), 19.0 (C-19), 18.5 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **8** 为白前苷元 A 3-O- β -D-吡喃夹竹桃糖苷。

化合物 **9**: 无色固体 (甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 315[M+H]⁺, 结合 ¹H-和 ¹³C-NMR 谱数据推测分子式为 C₂₁H₃₀O₂。¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 6.13 (1H, dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, H-6), 6.06 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 5.89 (1H, s, H-4), 3.96 (1H, m, H-20), 1.43 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 0.79 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 198.4 (C-3), 163.5 (C-5), 141.5 (C-7), 127.9 (C-6), 123.3 (C-4), 68.7 (C-20), 59.1 (C-14), 53.6 (C-17), 50.9 (C-9), 42.7 (C-13), 38.9 (C-12), 37.5 (C-8), 36.2 (C-10), 34.4 (C-1), 34.2 (C-2), 26.3 (C-16), 24.8 (C-21), 23.9 (C-15), 20.6 (C-11), 16.2 (C-19), 12.6 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **9** 为 20-羟基-4,6-二烯-孕甾-3-酮。

参考文献

- [1] Binkhathlan Z, Lavasanifar A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3): 326-346.
- [2] 钱钧强, 孙 蓓, 何景华. 抗肿瘤药物多药耐药性的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(11): 684-687.
- [3] Baguley B C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 46(3): 308-316.
- [4] 张 峰, 岑 娟. 肿瘤多药耐药模型的建立与评价方法 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5): 377-381.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 曾 粤. 徐长卿的研究进展 [J]. *内蒙古中医药*, 2012, 31(11): 125-126.
- [7] Sugama K, Hayashi K, Mitsunashi H, *et al*. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LXVI. The structures of three new glycosides, cynapanosides A, B, and C, from the Chinese drug "xu-chang-qing", *Cynanchum paniculatum* Kitagawa. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(11): 4500-4507.
- [8] Oh J Y, Kim C S, Lee K R. C₂₁ Steroidal glycosides from the root of *Cynanchum paniculatum* [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2013, 34(2): 637-640.
- [9] Kim C S, Oh J Y, Choi S U, *et al*. Chemical constituents from the roots of *Cynanchum paniculatum* and their cytotoxic activity [J]. *Carbohydr Res*, 2013, 381(1): 1-5.
- [10] 娄红祥, 李 锐, 朱廷儒. 华北白前中的 C₂₁ 甾体类化合物 [J]. *药学学报*, 1992, 27(8): 595-602.
- [11] Li S L, Tan H, Shen Y M, *et al*. A pair of new C-21 steroidal glycoside epimers from the roots of *Cynanchum paniculatum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(1): 82-84.
- [12] Bai H, Li W, Koike K, *et al*. Cynanosides A-J, ten novel pregnane glycosides from *Cynanchum atratum* [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(24): 5797-5811.
- [13] 窦 静, 毕志明, 张永清, 等. 徐长卿中的 C₂₁ 甾体化合物 [J]. *中国天然药物*, 2006, 4(3): 192-194.
- [14] Nakagawa T, Hayashi K, Mitsunashi H, *et al*. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LIII. The structures of glaucogenin-A, -B, and -C mono-D-thevetoside from the Chinese drug "Pai-ch'ien", *Cynanchum glaucescens* Hand. -Mazz. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(3): 870-878.
- [15] Nakagawa T, Hayashi K, Wada K, *et al*. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LII. The structures of glaucoside-A, -B, -C, -D, and -E from the Chinese drug "Pai-ch'ien", *Cynanchum glaucescens* Hand. -Mazz. [J]. *Tetrahedron*, 1983, 39(4): 607-612.
- [16] 谭 华. 徐长卿 C₂₁ 甾体类化合物成分的分离鉴定研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.